

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-005243
 (43)Date of publication of application : 10.01.1997

(51)Int.Cl.

G01N 21/78
 G01N 21/64
 G01N 33/483

(21)Application number : 07-157809
 (22)Date of filing : 23.06.1995

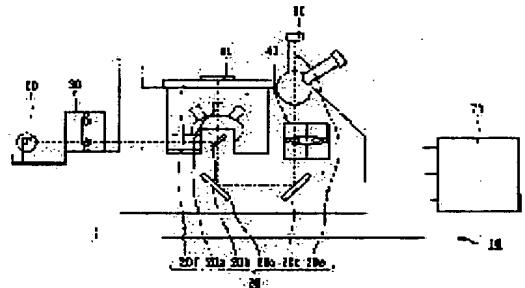
(71)Applicant : OKI ELECTRIC IND CO LTD
 (72)Inventor : KOYANO TAKESHI

(54) METHOD FOR SIMULTANEOUSLY MEASURING ION CONCENTRATION CHANGE IN CELL AND MEMBRANE POTENTIAL CHANGE

(57)Abstract:

PURPOSE: To simultaneously measure a change in ion concentration in a cell and a change in membrane potential by sequentially recording intensities of fluorescences from a living tissue every time a first and a second excitation lights are projected.

CONSTITUTION: A living tissue 80 to be measured is placed on a sample stage 20f of a fluorescent microscope 20. An excitation light selection filter-switching means 30 selectively switches excitation lights from a light of a light source 50 which excite a first and a second fluorescent pigments responding to an ion concentration change in cells or a membrane potential change and sends the light to the tissue 80. A fluorescence selection filter-switching means 40 selectively switches fluorescences generated from the first and second fluorescent pigments taken by the tissue 80, and a photodiode 60 measures the fluorescence. A control means 70 controls rotary discs of the means 30, 40 to synchronize with each other with a predetermined speed and a predetermined relationship, and also records outputs of the diode 60 in time sequence. At the measuring time, the control means 70 sequentially records intensities of fluorescences every time the first, second excitation light is projected and arranges the data of the intensities in time sequence. Accordingly, both the change in ion concentration and the change in membrane potential can be practically measured at the same time.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 22.01.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

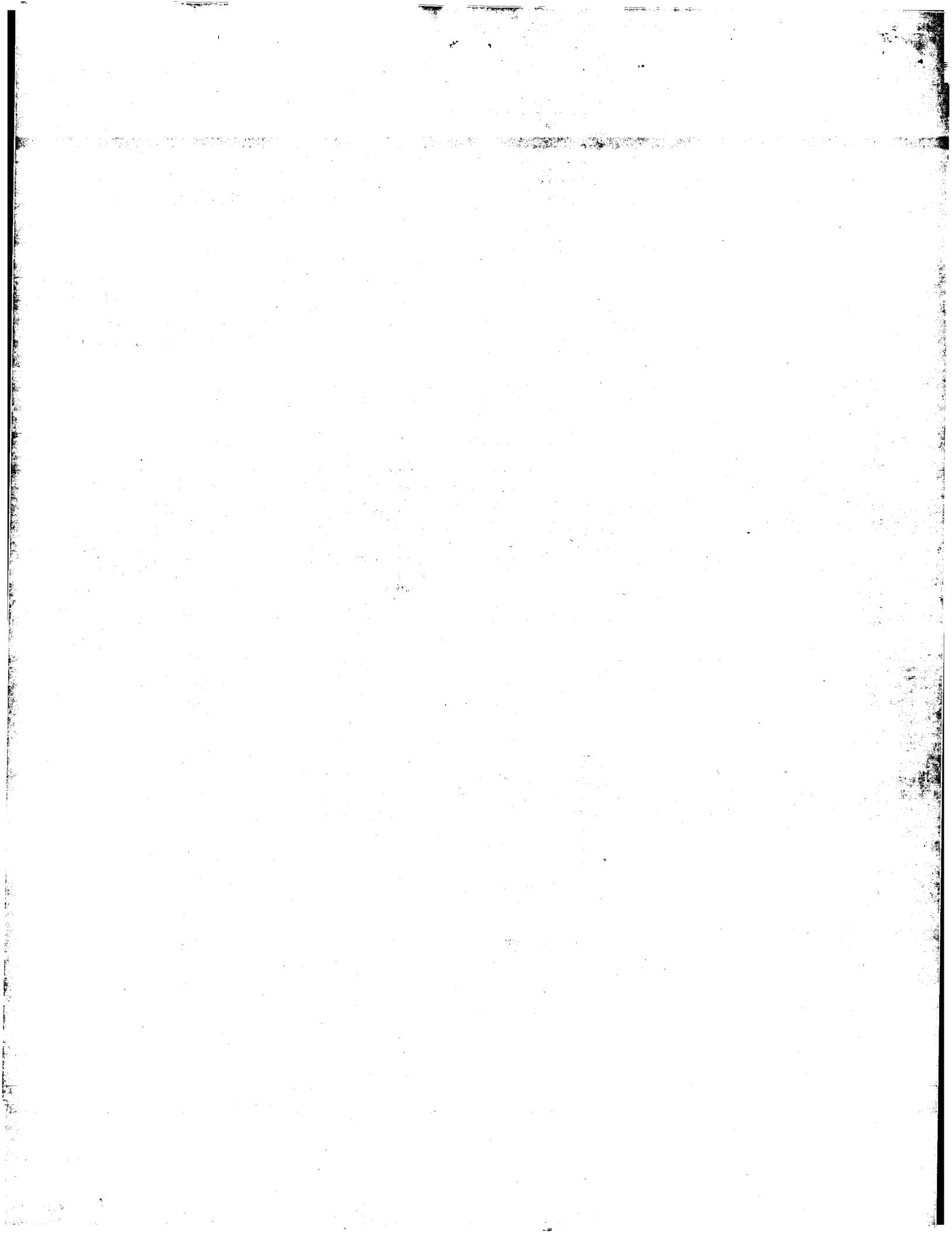
[Patent number] 3172060

[Date of registration] 23.03.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-5243

(43)公開日 平成9年(1997)1月10日

(51)Int.Cl.⁸
G 0 1 N 21/78
21/64
33/483

識別記号 庁内整理番号

F I
G 0 1 N 21/78
21/64
33/483

技術表示箇所
C
E
C

審査請求 未請求 請求項の数2 O.L (全10頁)

(21)出願番号 特願平7-157809

(22)出願日 平成7年(1995)6月23日

(71)出願人 000000295

沖電気工業株式会社
東京都港区虎ノ門1丁目7番12号

(72)発明者 小谷野 武

東京都港区虎ノ門1丁目7番12号 沖電気
工業株式会社内

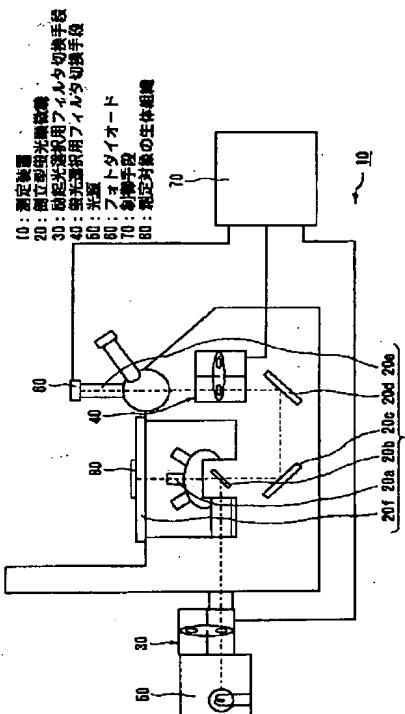
(74)代理人 弁理士 大垣 孝

(54)【発明の名称】細胞内イオン濃度変化および膜電位変化同時測定方法

(57)【要約】

【目的】細胞内イオン濃度変化および膜電位変化を同時測定できる新規な方法を提供する。

【構成】測定対象の生体組織を、細胞内イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する第1の蛍光色素および膜電位変化に応答して蛍光強度が変化する第2の蛍光色素それぞれにより処理する。該処理済みの生体組織80に対し前記第1の蛍光色素を励起する第1の励起光および前記第2の蛍光色素を励起する第2の励起光を時分割で照射する。この照射において、前記第1の励起光を照射するごとの前記生体組織から発せられる蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光を照射するごとの前記生体組織から発せられる蛍光強度を順次に記録する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 測定対象の生体組織を、細胞内イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する第1の蛍光色素および膜電位変化に応答して蛍光強度が変化する第2の蛍光色素それにより処理をし、

該処理済みの生体組織に対し前記第1の蛍光色素を励起する第1の励起光および前記第2の蛍光色素を励起する第2の励起光を時分割で照射すると共に、

前記第1の励起光を照射するごとの前記生体組織から発せられる蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光を照射するごとの前記生体組織から発せられる蛍光強度を順次に記録することを特徴とする細胞内イオン濃度変化および膜電位変化同時測定方法（ただし、前記第1の蛍光色素は2種以上の細胞内イオンごとの2種以上の蛍光色素であっても良く、その場合、前記第1の励起光をこれら蛍光色素ごとの励起光とし、前記時分割による照射においては該蛍光色素ごとの励起光も時分割照射するものとし、かつ、前記蛍光強度の記録も蛍光色素ごとに行なうものとする）。

【請求項2】 請求項1に記載の細胞内イオン濃度変化および膜電位変化同時測定方法において、

前記励起光用の光源として前記第1の励起光および第2の励起光を含む光を発する1つの光源を用い、

前記各蛍光強度の記録を共通の測定系により行なうものとし、および、

前記光源と生体組織との間に前記第1の励起光選択用フィルタおよび前記第2の励起光選択用フィルタを前記時分割で照射される励起光に対応する順で挿入し、かつ、該生体組織と前記測定系との間に前記第1の蛍光色素からの蛍光選択用フィルタおよび第2の蛍光色素からの蛍光選択用フィルタを前記時分割で照射される励起光により生じる蛍光に対応する順で挿入することを特徴とする細胞内イオン濃度変化および膜電位変化同時測定方法

（ただし、前記第1の蛍光色素を2種以上の異なる細胞内イオンごとの2種以上の蛍光色素とする場合、前記励起光選択用フィルタおよび蛍光選択用フィルタそれぞれは該2種以上の蛍光色素用の励起光および蛍光を考慮した複数の波長選択フィルタを含むものとする。）。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、細胞内イオンの濃度変化および膜電位変化それぞれを実質同時に測定できる方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体細胞では生体の活動に伴い膜電位や細胞内のイオン濃度例えばカルシウム、カリウム、塩素、ナトリウムなどの各イオンの濃度が変化することが知られている。またこれら膜電位の変化やイオン濃度の変化は、生体における情報伝達のメカニズムを構築する一因になっていると考えられている。このため生体を研

究するに当たり、膜電位変化（活動電位すなわち一過性の膜電位変化も含む。以下、同様。）や細胞内イオン濃度変化を測定することが、重要なとなる。従来、膜電位の測定には電極法が、イオン濃度変化の測定には蛍光観察法が用いられていた。前者は、細胞で生じる膜電位変化を細胞に予め刺した複数の電極で検出する方法である。後者は、細胞をイオン濃度変化に応答し蛍光強度が変化する蛍光色素により予め処理（染色）しておき、この蛍光強度を観察する方法である。また、生体の研究においては、膜電位変化とイオン濃度変化との相互関係をみるために、両変化を同時に測定することが多々ある。その場合は、上記電極法と蛍光観察法とを組み合わせて当該測定がなされていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】ところで、電極法では、その原理上細胞に電極を刺すことが不可欠となる。しかし、カエル脳下垂体に代表される微細な神経繊維やモルモット小腸自律神経細胞に代表される強固な結合組織で覆われた細胞に電極を刺すことは困難である。このため、カエル脳下垂体やモルモット小腸自律神経細胞などについて、細胞内イオン濃度変化の測定および膜電位変化の測定を同時に行なう場合は、細胞内イオン濃度変化に応答し蛍光強度が変化する蛍光色素および膜電位変化に応答し蛍光強度が変化する蛍光色素により測定対象の生体組織を予め処理しておき、この生体組織からの蛍光強度を観察する方法が考えられる。しかしながら、膜電位変化の測定および細胞内のイオン濃度変化の測定を同時に行なう際にこれらの測定に単に蛍光観察法を適用すると、例えば膜電位変化に応答し出力される蛍光の波長とイオン濃度変化に応答し出力される蛍光の波長が近接している場合などは両蛍光の分離が困難となるから、膜電位変化および細胞内のイオン濃度変化の同時測定が行なえない場合が生じる。また、両蛍光の波長が近接していないとしても、両蛍光を同時に測定するためには生体組織から発せられる光を分割することになるが、そうすると蛍光光自体が減衰するのでS/N比の問題等でやはり膜電位変化および細胞内のイオン濃度変化の同時測定が行なえない場合が生じる。微細な細胞や強固な結合組織で覆われた細胞などについても、膜電位変化の測定および細胞内のイオン濃度変化の測定を同時に行なえる方法が望まれる。

【0004】

【課題を解決するための手段】そこで、この発明によれば、細胞内イオン濃度変化および膜電位変化を同時に測定するため、測定対象の生体組織を細胞内イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する第1の蛍光色素および膜電位変化に応答して蛍光強度が変化する第2の蛍光色素それにより処理をし、該処理済みの生体組織に対し前記第1の蛍光色素を励起する第1の励起光および前記第2の蛍光色素を励起する第2の励起光を時分割で照

射すると共に、前記第1の励起光を照射するとの前記生体組織から発せられる蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光を照射するとの前記生体組織から発せられる蛍光強度を順次に記録することを特徴とする。

【0005】ただし、この発明において前記第1の蛍光色素は2種以上の細胞内イオンごとの2種以上の蛍光色素であっても良い。その場合は、前記第1の励起光をこれら2種以上の蛍光色素ごとの励起光とし、前記時分割による照射においては該蛍光色素ごとの励起光も時分割照射し、かつ、蛍光強度の記録もこれら2種以上の蛍光色素ごとにするものとする。

【0006】なお、この発明の実施に当たり、前記励起光用の光源として前記第1の励起光および第2の励起光を含む光を発する1つの光源を用い、前記各蛍光強度の記録を共通の測定系により行なうものとし、および、前記光源と生体組織との間に前記第1の励起光選択用フィルタおよび前記第2の励起光選択用フィルタを前記時分割で照射される励起光に対応する順で挿入し、かつ、該生体組織と前記測定系との間に前記第1の蛍光色素からの蛍光選択用フィルタおよび第2の蛍光色素からの蛍光選択用フィルタを前記時分割で照射される励起光により生じる蛍光光に対応する順で挿入するのが良い。こうすると光源および測定系それを細胞内イオン濃度変化の測定および膜電位変化の測定それそれで共用できるからである。ただし、前記第1の蛍光色素を2種以上の異なる細胞内イオンごとの2種以上の蛍光色素とする場合は、この好適例においては、前記励起光選択用フィルタおよび蛍光選択用フィルタそれぞれは該2種以上の蛍光色素用の励起光および蛍光を考慮した複数の波長選択フィルタを含むものとする。

【0007】

【作用】この発明の構成によれば、測定対象の生体組織に対し、細胞内イオン濃度変化を測定対象とする蛍光観察法と、膜電位変化を測定対象とする蛍光観察法とが、時分割の形で実施される。しかも、測定対象ごとに蛍光強度が順次に記録される。ここで、膜電位変化および細胞内イオン濃度変化おのおのは、時分割で測定されるから、実際は連続するデータとならないのであるが、時分割の間隔を適正化すれば、膜電位変化および細胞内イオン濃度変化おのおのは、実質的に同時に測定されたものとみなせる。また、両測定を時分割により実施しているから、両測定の蛍光の波長が近接している場合であっても、各蛍光は正確に測定できるし、また、蛍光を2分割するようなことも必要ない。

【0008】

【実施例】以下、図面を参照してこの発明の実施例について説明する。ただし、説明に用いる各図はこの発明を理解出来る程度に概略的に示してある。また、説明に用いる各図において同様な構成成分については同一の番号を付し、その重複する説明を省略することもある。

【0009】1. 用いた装置の説明

後にいくつかの実施例を挙げて細胞内イオンの濃度変化と膜電位変化とをこの発明の方法により同時に測定する例を説明するが、これら測定のためここでは図1～図3を参照して以下に説明するような測定装置を用いた。そこではじめにこの測定装置について説明する。ここで、図1は測定装置10の全体構成図、図2は第1の励起光選択用フィルタ35と第2の励起光選択用フィルタ37とを切り換えるための励起光選択用フィルタ切換手段30の説明図、図3は第1の蛍光選択用フィルタ41と第2の蛍光選択用フィルタ43とを切り換えるための蛍光選択用フィルタ切換手段40の説明図である。

【0010】この測定装置10は、倒立型蛍光顕微鏡（以下、蛍光顕微鏡ともいう）20と、励起光選択用フィルタ切換手段30と、蛍光選択用フィルタ切換手段40と、光源50と、フォトダイオード60と、制御手段70とを具える。なお、図1において80は測定対象の生体組織である。

【0011】ここで、蛍光顕微鏡20は周知のものとできる。図1において、20aは対物レンズ、20bはハーフミラー、20c、20dはそれぞれミラー、20eは接眼レンズ、20fは試料台をそれぞれ示す。

【0012】また、励起光選択用フィルタ切換手段30は、光源50から発せられた光のうち、細胞内イオン濃度変化に応答する第1の蛍光色素を励起するための第1の励起光を測定対象の生体組織に選択的に送るか、膜電位変化に応答する第2の蛍光色素を励起するための第2の励起光を測定対象の生体組織に選択的に送るかを切り換えるもので、ここでは以下に図2を用いて説明する構成のものとしてある。すなわち、励起光選択用フィルタ切換手段30はこの場合、容器31と、回転円板円板33と、第1の励起光選択用フィルタ35と、第2の励起光選択用フィルタ37と、回転円板駆動手段39とで構成してある。ただし、容器31はその壁面のうちの対向する壁面31a、31bに光透過用の互いに対向する窓31xを有したものとしてある。また、回転円板33はその板面が容器31の壁面31a、31bに対向するよう容器31内に収納されていて、然も、板面の所定の複数位置に第1及び第2の励起光選択用フィルタ35、37を設置するための開口部を有したものとなっている。この所定位置とは、この場合、円板31における容器31の窓31xと対向し得る円周上であって、180°ずれた2個所としてある。また第1及び第2の励起光選択用フィルタ35、37は、任意好適なもので構成出来るが、ここでは干渉フィルタで構成してある。また、回転円板駆動手段39は例えばモータで構成でき出来制御手段70によって制御されるものである。

【0013】また、蛍光選択用フィルタ切換手段40は、測定対象の生体組織に取り込まれた第1の蛍光色素から発せられる蛍光を選択的にフォトダイオード60に

送るか、同じく取り込まれた第2の色素から発せられる蛍光を選択的にフォトダイオード60に送るかを切り換えるもので、用いるフィルタを、第1の蛍光色素からの蛍光を選択する透過波長を有するフィルタ41および第2の蛍光色素からの蛍光を選択する透過波長を有するフィルタ43とした点が異なること以外は(図3参照)、基本的には励起光選択用フィルタ切換手段30と同じ構成としてある。

【0014】上述の励起光選択用フィルタ切換手段30および蛍光選択用フィルタ切換手段40それぞれは、所定の複数のフィルタを有した回転円板31を回転させてフィルタの切換をするので、例えば個々にフィルタを切換挿入したり、複数のフィルタを直線状に配置しこれをスライドさせてフィルタを切換挿入する場合に比べ、フィルタの切換が容易である。

【0015】また、光源50は、上記第1の蛍光色素を励起するための第1の励起光と上記第2の蛍光色素を励起するための第2の励起光を少なくとも含む光を発するもので、この場合はキセノンアークランプで構成してある。

【0016】また、フォトダイオード60は、測定対象の生体組織80から蛍光顕微鏡を経て送られてくる蛍光を測定するもので、周知のもので構成してある。

【0017】また、制御手段70は、励起光選択用フィルタ切換手段30、蛍光選択用フィルタ切換手段40に備わる各回転円板31を所定の速度でかつ手段30側の各フィルタ33または35と、手段40側の各フィルタ41または43とが、所定の関係で同期するよう制御すること、および、フォトダイオード60からの出力を時系列が分かる状態で記録する機能を有したものである。

【0018】これら構成成分20、30、40、50、60を、光源50から出た励起光が励起光選択用フィルタ切換手段30を介し生体組織80の蛍光色素を励起出来、かつ、生体組織に取り込まれた蛍光色素からの蛍光が蛍光選択用フィルタ選択手段40を介しフォトダイオード60に入力出来るように、図1に示す様に配置する。

【0019】2. 測定例の説明

次に、細胞内イオン濃度変化および膜電位変化を同時に測定するいくつかの例を説明する。

【0020】2-1. 第1実施例

先ず、測定対象の生体組織をカエル脳下垂体とし、このカエル脳下垂体における細胞内カルシウムイオン濃度変化および膜電位変化を、この発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0021】このため、カエル脳下垂体を第1および第2の蛍光色素で処理する。これをこの実施例では次の様に行なう。細胞内イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する第1の蛍光色素としてカルシウムイオン濃度変化に応答するFura 2-AM (Sigma社製) を3

0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、および、膜電位に応答して蛍光強度が変化する第2の蛍光色素(すなわち膜電位感受性蛍光色素)としてM540(コダック社製)を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でそれぞれ含み、かつ、pHが7.5に調整されたリングル液を用意する。ここで、Fura 2-AMは波長340 nmの光で励起されて波長500 nmの蛍光を発するものである。また、M540は波長530 nmの光で励起されて波長580 nmの蛍光を発するものである。次に、体長約5 cmのアフリカツメガエル(Xenopus)から抽出した下垂体をこのリングル液中に30分浸漬する。これにより、カエル脳下垂体に対する第1及び第2の色素による処理が行なえる。その後、この試料をリングル液で洗浄する。このように蛍光色素による処理の済んだカエル脳下垂体を、リングル液を満たしてあるシャーレ中に入れた状態で、蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置く。

【0022】また、図1～図3を用いて説明した測定装置に、フィルタ35として透過波長が340 nmでかつ透過帯域幅が20 nmのフィルタを、またフィルタ37として透過波長が530 nmでかつ透過帯域幅が10 nmのフィルタを、またフィルタ41として透過波長が500 nmでかつ透過帯域幅が10 nmのフィルタを、またフィルタ43として透過波長が580 nmでかつ透過帯域幅が20 nmのフィルタを、それぞれ設置する。また、蛍光顕微鏡20の倍率を20倍とする。この倍率は蛍光測定に好適な様に設定されたものである。もちろん、この倍率は一例である。

【0023】次に、光源50からの出力光の光軸上に透過波長が340 nmであるフィルタ35が位置した時は、フォトダイオード60への蛍光の光軸上に透過波長が500 nmであるフィルタ41が位置するように、一方、光源50からの出力光の光軸上に透過波長が530 nmであるフィルタ37が位置した時は、フォトダイオード60への蛍光の光軸上に透過波長が580 nmであるフィルタ43が位置するように、各フィルタの同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。ここで、前者のフィルタ位置はカルシウムイオン濃度変化の測定モードとなり、後者のフィルタ位置は膜電位変化の測定モードとなる。またここでは、回転円板31を10⁶回/秒の速度で回転させた。もちろん、この回転速度は設計に応じ変更出来る。ただし、この測定装置10の場合は、この回転円板31の回転速度でイオン濃度変化、膜電位変化おのおののサンプリング周期したがってデータの分解能が決まるので、上記回転速度の決定はこの点を考慮する。

【0024】また、測定時は、第1の励起光である波長340 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長530 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それらの蛍光強度のデータを時系列に並べると、細胞

内のカルシウム濃度変化および膜電位変化を実質同時に測定出来たことになる。図4はこの結果を示した特性図である。図4において破線Iが細胞内カルシウムイオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。なお、図4において横軸は時間(秒)であり縦軸は蛍光強度(任意単位)である。この図4から、微細な神経纖維に相当するカエル脳下垂体であっても、細胞内カルシウムイオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図4から、カエル脳下垂体で特徴的なカルシウムチャネルの開閉に起因するダウンストローク(図中P)と細胞内カルシウム濃度の上昇とが一致しているのが分かる。

【0025】2-2. 第2実施例

また、測定対象の生体組織をモルモット小腸自律神経(submucous plexus)とし、このモルモット小腸自律神経における細胞内カルシウムイオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0026】このため、体重約150gの生後2週間のモルモットから小腸自律神経を抽出する。この抽出した小腸自律神経を、95%酸素/5%二酸化炭素の環流により酸素濃度を上げたリングル液であって上記Fura-2-AMを30μg/mlの濃度で、および、小腸自律神経用に適した膜電位感受性蛍光色素としてDi-8-ANNEPSを100μg/mlの濃度でそれぞれ含み、かつ、pHを7.0に調整したリングル液中に、10分間浸漬する。これにより小腸自律神経に対する第1および第2の蛍光色素による処理が行なえる。その後、この試料をリングル液で清浄する。次に、この試料を、それが死ぬのを防ぐため、95%酸素/5%二酸化炭素の環流により酸素濃度を上げたリングル液(所定のリングル液)が満たされかつ循環されているシャーレ)に入れた状態で、蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置いた。なお、ここで用いた膜電位感受性蛍光色素Di-8-ANNEPSは、たとえば文献I(バイオフィジックスジャーナル(Biophys.J.)(1994)67(1) 208-16)に開示されているものであり、この出願に係る発明者が入手したものである。また、この膜電位感受性蛍光色素Di-8-ANNEPSは、波長530nmの励起光で励起されて波長580nmの蛍光を発するものである。またこの第2実施例では、蛍光顕微鏡20の倍率は100倍とする。

【0027】次に、第1実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長340nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長530nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図6はこの結果を示した特性図である。

同様にプロットする。図5はこの結果を示した特性図である。図5において破線Iが細胞内カルシウムイオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図5から、強固な結合組織で覆われた細胞に相当する小腸自律神経であっても、細胞内カルシウムイオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図5から、急峻な膜電位変化(活動電位)の後にゆっくりとしたカルシウム濃度の上昇が見られることが分かる。

【0028】2-3. 第3実施例

また、カエル脳下垂体における細胞内カリウムイオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0029】このため、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素として、細胞内カリウムイオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する蛍光色素であるPBF1-AM(Sigma社製)を30μg/mlの濃度で用いること以外は、第1実施例と同様にして、カエル脳下垂体に対する蛍光色素による処理をする。そして、この生体組織を、第1実施例と同様に、リングル液を満たしたシャーレに入れた状態で蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置く。なお、PBF1-AMは波長360nmの光で励起されて波長570nmの蛍光を発するものである。

【0030】また、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素をPBF1-AMに代えたことに対応して、図1～図3を用いて説明した測定装置におけるフィルタ35を透過波長が360nmでかつ透過帯域幅が20nmのフィルタに交換し、かつ、フィルタ41を透過波長が570nmでかつ透過帯域幅が10nmのフィルタに交換する。

【0031】次に、第1実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長360nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長530nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図6はこの結果を示した特性図である。図6において破線Iが細胞内カリウムイオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図6から、微細な神経纖維に相当するカエル脳下垂体であっても、細胞内カリウムイオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図6から、カエル脳下垂体で特徴的なカリウム依存性カリウムチャネルの開閉に起因するダウンストローク(図中P)と細胞内カリウム濃度の上昇とが一致しているのが分かる。

【0032】2-4. 第4実施例

また、モルモット小腸自律神経における細胞内カリウム

イオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0033】このため、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素として、細胞内カリウムイオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する蛍光色素であるPBF1-A M (Sigma社製)を30 μg/m1の濃度で用いること以外は、第2実施例と同様にして、モルモット小腸自律神経に対する蛍光色素による処理をする。そして第2実施例同様に、この生体組織を9.5%酸素/5%二酸化炭素の環流により酸素濃度を上げたリングル液(所定のリングル液)が満たされかつ循環されているシャーレに入れた状態で、蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置いた。

【0034】次に、第1実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長360 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長530 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図7はこの結果を示した特性図である。図7において破線Iが細胞内カリウムイオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図7から、強固な結合組織で覆われた細胞に相当する小腸自律神経であっても、細胞内カリウムイオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図7から、急峻な膜電位変化(活動電位)の後にゆっくりとしたカリウム濃度の上昇が見られることが分かる。

【0035】2-5. 第5実施例

また、カエル脳下垂体における細胞内塩素イオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0036】このため、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素として、塩素イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する蛍光色素である6-メトキシ-N-3-サルフォプロビルーキノリニウム[6-Methoxy-N-(3-Sulfonylpropyl)-Quinolinium-] (Sigma社製)を30 μg/m1の濃度で用いること以外は、第1実施例と同様にして、カエル脳下垂体に対する蛍光色素による処理をする。そして、この生体組織を、第1実施例と同様に、リングル液を満たしたシャーレに入れた状態で蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置く。なお、6-メトキシ-N-3-サルフォプロビルーキノリニウムは波長350 nmの光で励起されて波長450 nmの蛍光を発するものである。

【0037】また、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素を6-メトキシ-N-3-サルフォプロビルーキノリニウムに代えたことに対応して、図1～図3を用い

て説明した測定装置におけるフィルタ35を透過波長が350 nmかつ透過帯域幅が20 nmのフィルタに交換し、かつ、フィルタ41を透過波長が450 nmかつ透過帯域幅が10 nmのフィルタに交換する。

【0038】次に、第1実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長350 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長530 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図8はこの結果を示した特性図である。図8において破線Iが細胞内塩素イオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図8から、微細な神経繊維に相当するカエル脳下垂体であっても、細胞内塩素イオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図8から、カエル脳下垂体で神経パルスの発生初期に塩素の移動が起きていることが分かる。

【0039】2-6. 第6実施例

また、モルモット小腸自律神経における細胞内塩素イオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0040】このため、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素として、細胞内塩素イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する蛍光色素である6-メトキシ-N-3-サルフォプロビルーキノリニウムを30 μg/m1の濃度で用いること以外は、第2実施例と同様にして、モルモット小腸自律神経に対する蛍光色素による処理をする。そして、第2実施例同様に、この生体組織を9.5%酸素/5%二酸化炭素の環流により酸素濃度を上げたリングル液(所定のリングル液)が満たされかつ循環されているシャーレに入れた状態で、蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置いた。

【0041】次に、第1実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長350 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長530 nmの励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図9はこの結果を示した特性図である。図9において破線Iが細胞内塩素イオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図9から、強固な結合組織で覆われた細胞に相当する小腸自律神経であっても、細胞内塩素イオン濃度変化および膜電位変化共に良

好に測定できていることが分かる。

【0042】2-7. 第7実施例

また、カエル脳下垂体における細胞内ナトリウムイオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0043】このため、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素として、細胞内ナトリウムイオン濃度変化に応答し蛍光強度が変化する蛍光色素であるSBFI-AM (Sigma社製) を $3.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いること以外は、第1実施例と同様にして、カエル脳下垂体に対する蛍光色素による処理をする。そして、この生体組織を、第1実施例と同様に、リングル液を満たしたシャーレに入れた状態で蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置く。なお、SBFI-AMは波長 400nm の光で励起されて波長 570nm の蛍光を発するものである。

【0044】また、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素をSBFI-AMに代えたことに対応して、図1～図3を用いて説明した測定装置におけるフィルタ35を透過波長が 400nm でかつ透過帯域幅が 20nm のフィルタに交換し、フィルタ41を透過波長が 570nm でかつ透過帯域幅が 10nm のフィルタに交換する。

【0045】次に、第1実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長 400nm の励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長 530nm の励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図10はこの結果を示した特性図である。図10において破線Iが細胞内ナトリウムイオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図10から、強固な結合組織で覆われた細胞に相当する小腸自律神経であっても、細胞内ナトリウムイオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図10から、急峻な細胞内ナトリウム濃度の上昇が見られることが分かる。

【0046】2-8. 第8実施例

また、モルモット小腸自律神経における細胞内ナトリウムイオン濃度変化および膜電位変化をこの発明の方法により以下に説明するように測定する。

【0047】このため、細胞内イオン濃度変化に応答する蛍光色素として、細胞内ナトリウムイオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する蛍光色素であるSBFI-AM (Sigma社製) を $3.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で用いること以外は、第2実施例と同様にして、モルモット小腸自律神経に対する蛍光色素による処理をする。そして、第2実施例同様に、この生体組織を95%酸素/5%二酸化炭素の環流により酸素濃度を上げたリングル液

(所定のリングル液) が満たされかつ循環されているシャーレ) に入れた状態で、蛍光顕微鏡20の試料台20f上に置いた。

【0048】次に、第7実施例において説明したと同様な手順で、各フィルタ35、37、41、43の同期を確保しつつ、フィルタ選択手段30、40の回転円板31を、所定速度で回転させる。また、測定時は、第1の励起光である波長 400nm の励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録し、かつ、第2の励起光である波長 530nm の励起光が照射されるごとの蛍光強度を順次に記録する。それぞれの蛍光強度のデータを図4と同様にプロットする。図11はこの結果を示した特性図である。図11において破線Iが細胞内ナトリウムイオン濃度変化に対応する蛍光強度変化であり、実線IIが膜電位変化に対応する蛍光強度変化である。この図11から、強固な結合組織で覆われた細胞に相当する小腸自律神経であっても、細胞内ナトリウムイオン濃度変化および膜電位変化共に良好に測定できていることが分かる。また図11から、急峻な細胞内ナトリウム濃度の上昇が見られることが分かる。

【0049】上述においては、この発明のいくつかの実施例について説明したがこの発明は上述の実施例に限られない。例えば、上述では膜電位変化および1種の細胞内イオンの濃度変化を同時に測定する例を説明したが、膜電位変化と例えば2種以上の細胞内イオン濃度のそれぞれの変化とを同時に測定することも可能と考える。一例で説明すれば、例えば細胞内カルシウムイオンに応答して蛍光強度が変化する蛍光色素と、細胞内ナトリウムイオンに応答して蛍光強度が変化する蛍光色素とを、膜電位感受性蛍光色素と共に用いて生体組織を処理し、その後、3種類の蛍光色素について時分割による励起光照射や蛍光強度記録を処理をするようにすれば、細胞内カルシウムイオン濃度変化、細胞内ナトリウムイオン濃度変化および膜電位変化を同時に測定できると考える。また上述において説明した測定装置は一例にすぎず、他の任意好適な構成とできる。

【0050】

【発明の効果】上述した説明から明らかのように、この発明によれば、測定対象の生体組織を、細胞内イオン濃度変化に応答して蛍光強度が変化する第1の蛍光色素および膜電位変化に応答して蛍光強度が変化する第2の蛍光色素それそれにより処理する。そして、該処理済みの生体組織に対し前記第1の蛍光色素を励起する第1の励起光および前記第2の蛍光色素を励起する第2の励起光を時分割で照射すると共に、各励起光照射ごとの前記生体組織から発せられる蛍光強度をそれぞれ順次に記録する。このため、蛍光観察法を利用して膜電位変化と少なくとも1種の細胞内イオン濃度変化とを実質同時に測定出来る。したがって、微細な細胞や強固な結合組織で覆われた細胞などについても、膜電位変化の測定および細

胞内のイオン濃度変化の測定を同時に行なうことが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の測定方法の実施に用いた測定装置の説明図である。

【図2】励起光選択用フィルタ切換手段の説明図である。

【図3】蛍光選択用フィルタ切換手段の説明図である。

【図4】第1実施例で得た特性の説明図である。

【図5】第2実施例で得た特性の説明図である。

【図6】第3実施例で得た特性の説明図である。

【図7】第4実施例で得た特性の説明図である。

【図8】第5実施例で得た特性の説明図である。

【図9】第6実施例で得た特性の説明図である。

【図10】第7実施例で得た特性の説明図である。

【図11】第8実施例で得た特性の説明図である。

【符号の説明】

10: 測定装置

20: 倒立型蛍光顕微鏡

30: 励起光選択用フィルタ切換手段

35: 第1の励起光選択用フィルタ

37: 第2の励起光選択用フィルタ

40: 蛍光選択用フィルタ切換手段

41: 第1の蛍光色素からの蛍光を選択するフィルタ

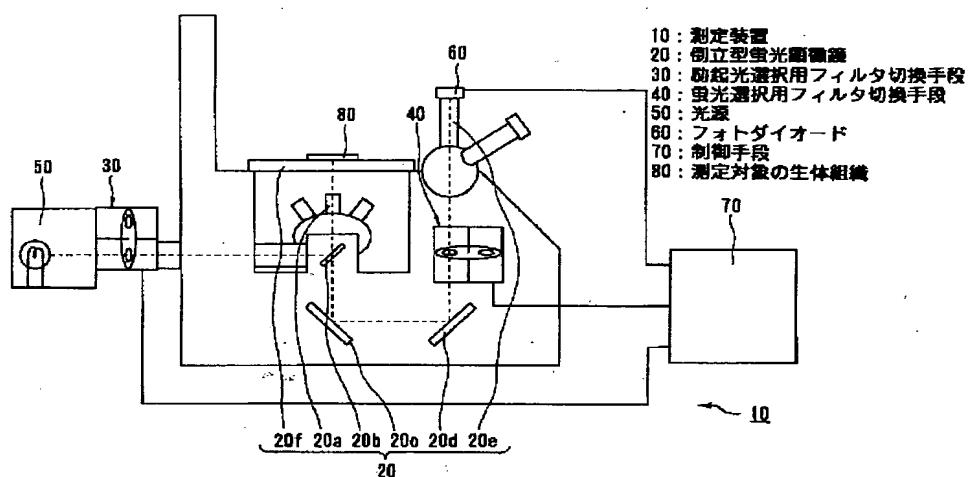
43: 第2の蛍光色素からの蛍光を選択するフィルタ

50: 光源

60: フォトダイオード

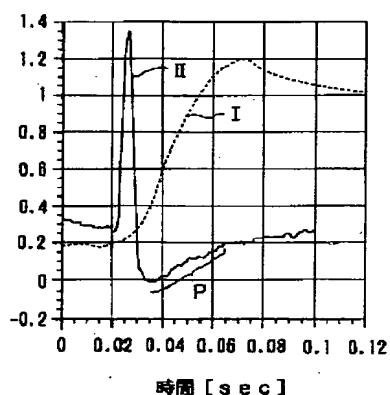
70: 制御手段

【図1】



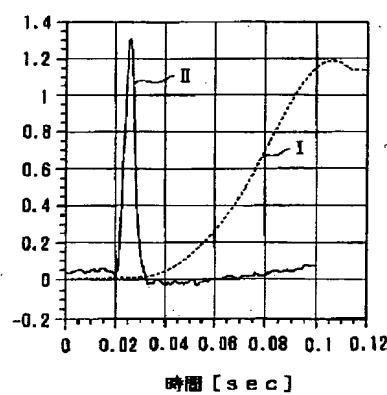
この発明の測定方法の実施に用いた装置の説明図

【図4】



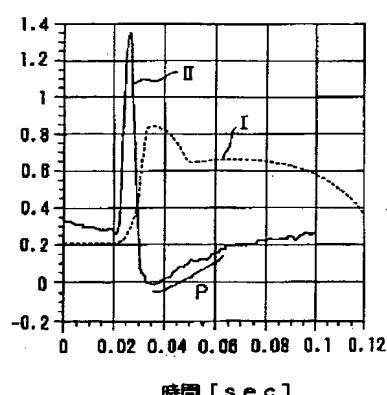
第1実施例で得た特性の説明図

【図5】



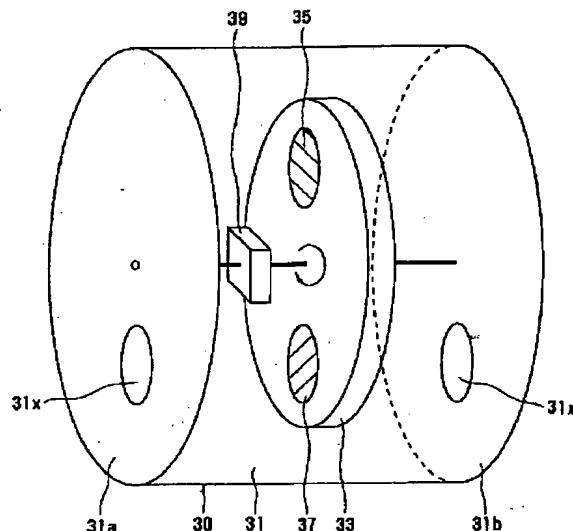
第2実施例で得た特性の説明図

【図6】



第3実施例で得た特性の説明図

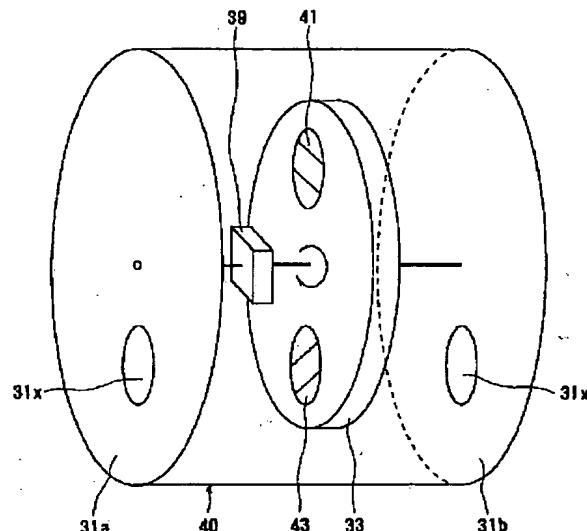
【図2】



30: 励起光選択用フィルタ切換手段
 31: 容器
 31a, 31b: 容器壁面
 31x: 窓
 33: 回転円板
 35: 第1の励起光選択用フィルタ
 37: 第2の励起光選択用フィルタ
 39: 回転円板駆動手段

励起光選択用フィルタ切換手段の説明図

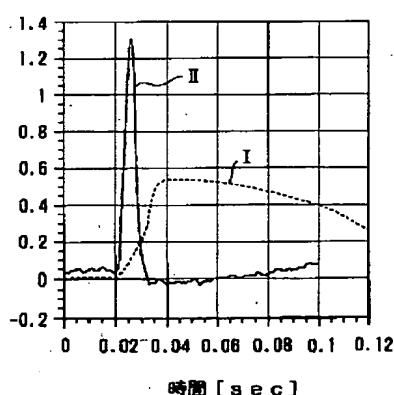
【図3】



40: 蛍光選択用フィルタ切換手段
 41: 第1の蛍光色素からの蛍光を選択するフィルタ
 43: 第2の蛍光色素からの蛍光を選択するフィルタ

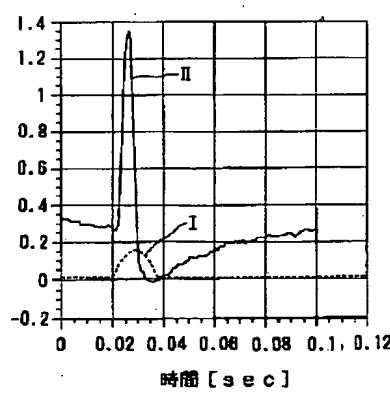
蛍光選択用フィルタ切換手段の説明図

【図7】



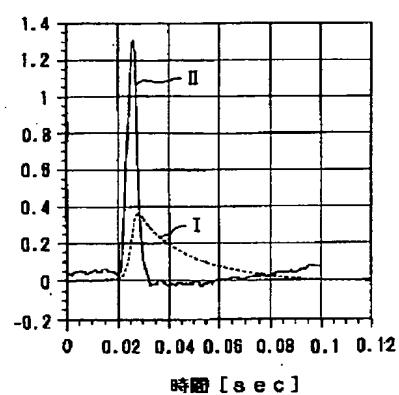
第4実施例で得た特性の説明図

【図8】



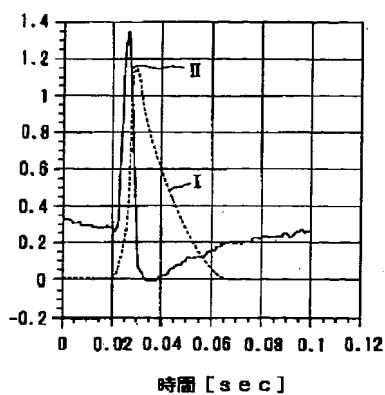
第5実施例で得た特性の説明図

【図9】



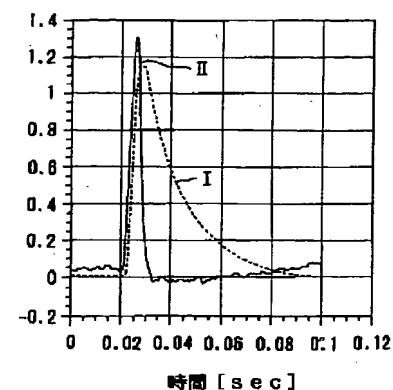
第6実施例で得た特性の説明図

【図10】



第7実施例で得た特性の説明図

【図11】



第8実施例で得た特性の説明図